

## 創傷治癒における線維芽細胞の超微構造的変化

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任：梶川欽一郎)

大 井 章 史

(昭和57年10月26日受付)

ラットの創傷治癒における線維芽細胞の超微構造的変化を創傷1日から7ヶ月にわたって光顕、電顕的に観察した。H<sup>3</sup>-チミジンを用いたオートラジオグラフィーの成績では線維芽細胞は主として小血管周囲の未分化間葉細胞から増殖することが示唆された。増殖した線維芽細胞の一部は筋線維芽細胞に変わり、創傷収縮に関与することが示された。創傷の瘢痕化とともに、線維芽細胞は、細胞小器官の減少と拡張した粗面小胞体の細胞外への穿通によってその容積を減少し、退縮することが観察された。この変化は不可逆的で、退縮線維芽細胞は瘢痕の再切創によってもH<sup>3</sup>-チミジンの取りこみはほとんどなく、活動性線維芽細胞に復帰することはなかった。瘢痕の線維芽細胞に、膠原線維を含む多数の空胞が観察され、酸性フォスファターゼ活性が証明された。これらの細胞内線維が膠原線維の貪食か、過剰に生産されたコラーゲンの分解かについて考察した。

---

**Key words** fibroblasts, myofibroblasts, scar, intracellular collagen fibers

---

創傷治癒における線維芽細胞の形態についてはすでに多くの研究<sup>1)~4)</sup>があるが、コラーゲン合成の活発な時期の線維芽細胞に比べて退縮時期の線維芽細胞に関する研究は少ない。また線維芽細胞の由来についても多くの説<sup>1)5)~11)</sup>があり、長い間、議論の争点となっている。1971年 Gabbiani ら<sup>12)</sup>、Majno ら<sup>13)</sup>は創傷肉芽組織でアクチンフィラメントを有する線維芽細胞を証明し、筋線維芽細胞と命名した。以来、筋線維芽細胞は多種の生理的、病的組織において注目され、創傷治癒においては創傷収縮の原動力となると考えられている<sup>12)~17)</sup>。一方、Baur ら<sup>18)</sup>は火傷瘢痕組織において空胞内に膠原線維をいれた線維芽細胞、筋線維芽細胞を報告し、それぞれ“fibroblast” “myofibroblast”と呼んだ。細胞内に膠原線維を有する線維芽細胞は他の多くの結合組織にも観察されており、新生結合組織の改造に関係しているものと推定されている<sup>18)19)</sup>。

筋線維芽細胞やいわゆる“fibroblast”は線維芽細胞のさまざまな機能相を示していると考えられるが、創傷治癒におけるこれらの細胞の出現時期、局在及び役割はまだ十分に解明されていない。

本研究は創傷直後から瘢痕に至るまでの線維芽細胞の超微形態を観察し、線維芽細胞がどこから増殖し、どのように退縮するかを調べるとともに、その間にみられる形態学的変化と機能を解明する目的で行われた。

### 材料及び方法

Wister系雄ラット(3週齢)の背側皮膚に皮膚移植用トレパンを用いて径0.5 cm及び1.0 cmの、皮下組織に達する円形創を形成し、創傷1日から7ヶ月の組織を採取した。また、創傷4ヶ月から7ヶ月の瘢痕に長さ0.5 cmの切創を作り、1, 3, 7日目に組織を採取した。瘢痕切創の対照として、瘢痕より充分離れた正常皮膚に同様な切創を加え組織を採取した。

電顕試料の作製：細切した組織を2.5%グルタルアルデヒド(0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4)と2%オスミウム酸(同緩衝液)でそれぞれ1時間、2時間固定し、エタノール系列脱水、エポン812で包埋した。

酸性フォスファターゼ反応：組織を2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド、0.025%CaCl<sub>2</sub>(0.09 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4)混合液で45分

---

Ultrastructural Changes of Fibroblasts in Wound Healing of Rats. Akishi Ooi, Department of Pathology (I), (Director: Prof. K. Kajikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

間固定後、ピプラトームで100 $\mu$ に薄切した切片を37°CでGomoriメジウム(0.05 M 酢酸塩緩衝液 50 ml, 蔗糖 4.0 g, 硝酸鉛 50 mg, 3%グリセリン酸ナトリウム 5.0 ml, pH 5.0)に60分間浸漬し、洗滌後、2%オスミウム酸(0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4)で2時間固定し、上記の方法で脱水、包埋した。

酸性ムコ多糖及び糖蛋白の検出: グルタルアルデヒド・ルテニウムレッド(以下RRと略す)混合液で組織を60分間固定し、ピプラトームで100~300 $\mu$ の切片を作製し、この切片をRR液で4時間洗滌後、オスミウム酸・R.R.混合液で4時間固定し、上記の方法で脱水、包埋した。

包埋された試料はダイヤモンドナイフを用い、LKB-Ultratomで超薄切片を作製し、酢酸ウラニール・硝酸鉛、0.02%リンタングステン酸を加えた酢酸ウラニール・硝酸鉛の二重染色、タンニン酸染色を行ない、日立電子顕微鏡H-500を用いて直接倍率2,400~10,000倍で観察した。

光顕的観察: 組織を10%中性緩衝液ホルマリンで固定し、パラフィン切片とし、Hematoxylin and Eosin (HEと略)、Periodic acid Schiff (PASと略)、鍍銀(Gomori法)、Elastica、Van Gieson (EVGと略)、Azan染色を施した。

光顕的ラジオオートグラフィー: 径0.5 cmの円形創を作製し、創傷1, 3, 5, 7日に $H^3$ -チミジン(Amersham, specific activity 43 Ci/m mol)を1 $\mu$ Ci/g体重、腹腔内投与し、45分後組織を採取した。また、創傷7ヶ月の瘢痕内に再创傷を加え、3日後、同様に $H^3$ -チミジンを投与して組織を採取した。薄切された切片はディッピング法を用いて乳剤(NTB-3, Kodak)を塗布し、2週間露光、Kodak・D-19を用いて5分間現像後、H-E染色で観察した。

創の表面積の測定: 塩酸ケタミン(「ケタラル」、三共)麻酔下に径1.0 cmの円形創の表面積を経時的に計測した。

## 成 績

### I. 創傷治療

#### 1. 光顕的所見

創傷1日目では創面にフィブリンの析出と好中球の浸潤があり、皮下組織の充血と水腫が認められる。創傷3日目から痂皮の間に舌状に創中心部へ向かって表皮細胞の再生がおこる。再生表皮直下には新生毛細血管と線維芽細胞の増殖が認められる。創縁の皮下組織の血管周囲に好塩基性単核細胞の集合がみられる。創傷5日目から毛細血管は創面にほぼ垂直方向に新生さ

れ、それに直交するように線維芽細胞が創深部から表層に向かって増殖する。径0.5 cmの創では約1週間、径1.0 cmの創では約2週間で創面は再生表皮で完全に被われる。増殖初期の線維芽細胞は星芒状であるが、細胞間に線維が沈着するにつれて紡錘形となる。線維は表皮に平行に走り細い。創傷4ヶ月以後では、細胞数は著明に減少し、肉芽組織は瘢痕に変わる。線維芽細胞は糸くず状となり、原形質はほとんど識別できない。PAS染色で表皮基底膜の肥厚がみられる。弾力線維は証明されない。初期の肉芽組織では線維芽細胞と大食細胞の鑑別は困難であるが、創傷4週以後では、ヘモジデリンを貪食した大食細胞が認められる。同時に肥肝細胞の浸潤もみられる。

#### 2. 電顕的所見

1日: 多量の線維素性、漿液性の滲出液と好中球の浸潤がみられる。線維芽細胞には脂肪滴や自家食泡がみられ、変性の徴候を示すものがある。

3日-1週: 創中心部では滲出性変化が強い。創縁ではフィブリン塊に接して表皮細胞の増殖がみられる。表皮細胞間の間隙は広く互いに原形質突起をのばし、先端で接着斑によって接合している。創縁の皮下組織には、大食細胞やリンパ球がみられる。毛細血管の周細胞、細静脈の外膜細胞及びその周辺の線維芽細胞に核分裂が認められる。未熟な線維芽細胞と思われる細胞は卵円形で、遊離リボソームが豊富で細胞小器官は乏しく、細管状の粗面小胞体、小さなゴルジ装置、糸粒体が散在性に認められる(図1)。

5日-2週: 線維芽細胞は新生毛細血管に直交するように増殖する。線維芽細胞には多数の核分裂が観察される。核分裂は毛細血管内皮細胞、周細胞、大食細胞にも観察される。線維芽細胞は著明な核小体と分散したクロマチンをもつ大型の核を有し、よく発達した粗面小胞体とゴルジ装置で特徴づけられる(図2)。粗面小胞体は層状に配列する管状の断面を示し互いに吻合する。小胞膜に付着するリボソームは渦巻状ないしはロゼッタ状、または2列に並んだ整然とした配列を示す。内腔の拡大した粗面小胞体には無定形物質がみられる。ゴルジ装置は、ゴルジ層板、小胞および空胞よりなるが、小胞と空胞の増加が目立つ。拡張したゴルジ空胞内に無定形、または微細フィラメント物質がみられる。微細フィラメント物質は平行に配列し、230~330 nmの間隔で約50 nmの顆粒状、帯状の部分が認められ、線維性長周期(fibrous long spacing, 以下FLSと略)線維様の形態を示す(図3)。ときどき粗面小胞体とゴルジ空胞が連結する像がみられる。ゴルジ小胞周辺にはcoated vesiclesが多数認められる。中心小体、まれに纖毛も認められる。リソソーム

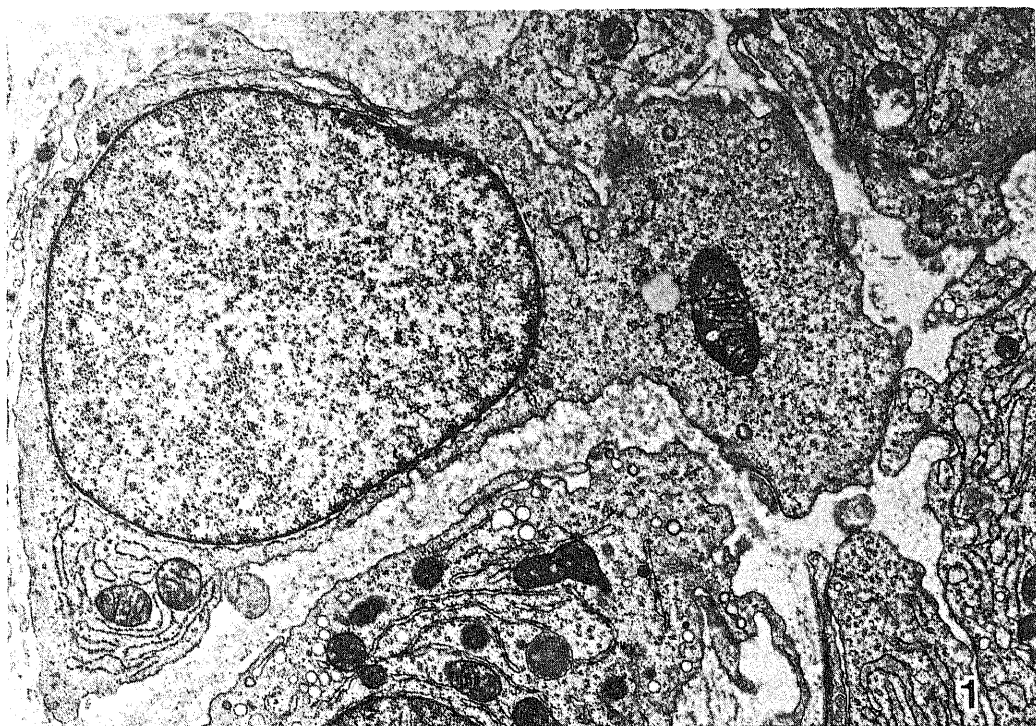


Fig. 1. An undifferentiated fibroblast around the venule in a 7 - day wound. It has a large nucleus and relatively small cytoplasm containing numerous ribosomes, in contrast with poor development of rough endoplasmic reticulum.  $\times 11,000$ .

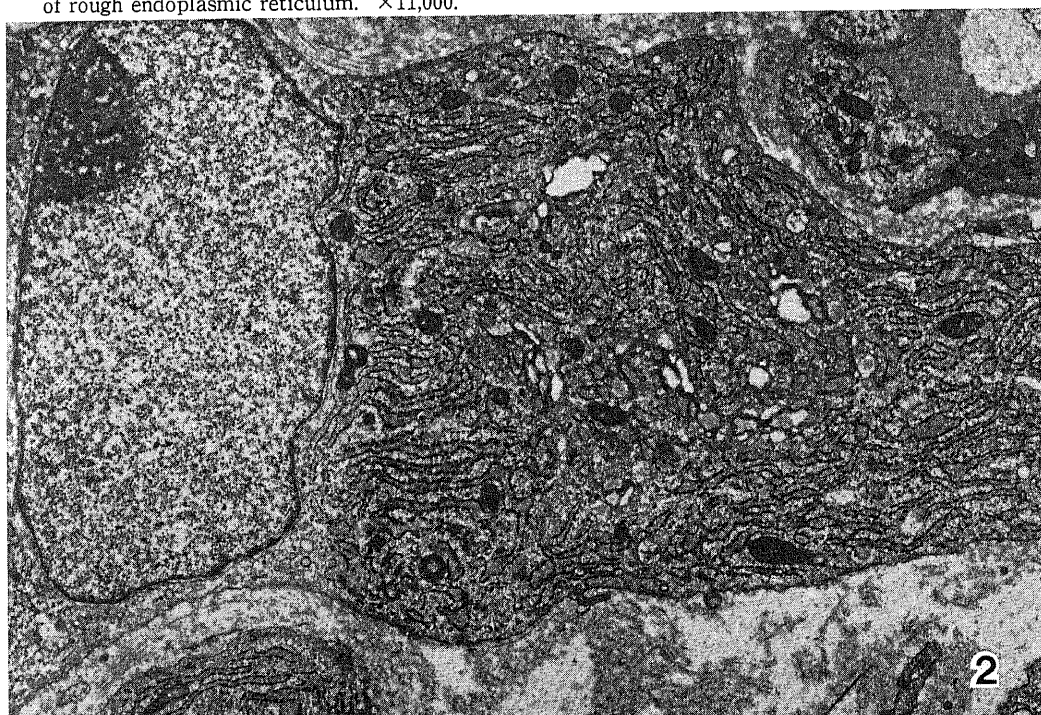


Fig. 2. A fibroblast in a 7 - day wound. Well developed rough endoplasmic reticulum is arranged in parallel, and Golgi apparatus is fairly well developed. There are thin collagen fibers in the extracellular matrix.  $\times 7,700$ .

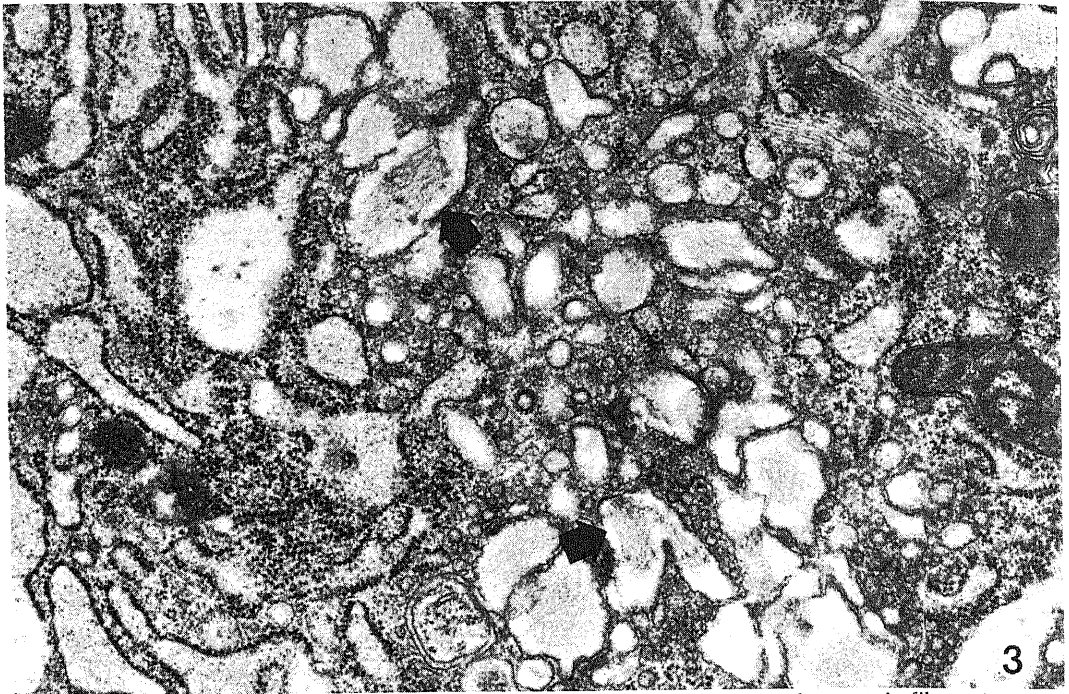


Fig. 3. Golgi apparatus of a fibroblast in a 2 week wound. The Golgi vacuoles contain filamentous structures, some of which show a pattern of fibrous long-spacing aggregates as indicated by arrows.  $\times 25,000$ .

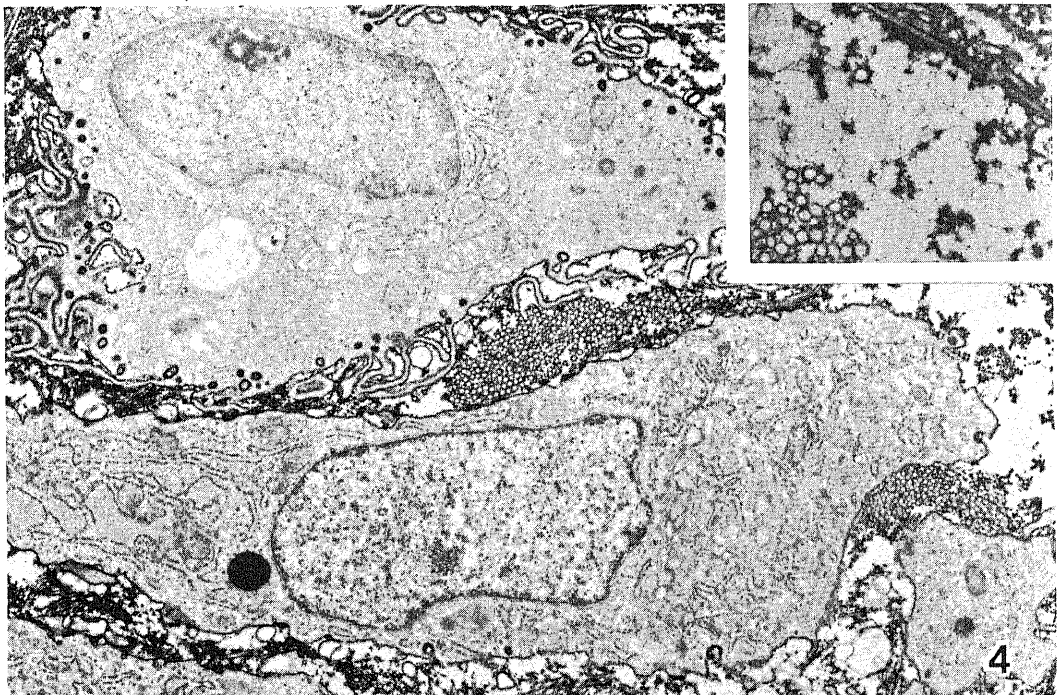


Fig. 4. A macrophage (upper) and a fibroblast in a 7-day wound, stained with ruthenium red (RR). The macrophage has RR-positive vesicles in the periphery of the cytoplasm. The fibroblast is invested by RR-positive materials. The intercellular matrix contains collagen fibers and proteoglycans (insert).  $\times 7,700$ , insert:  $\times 18,000$ .



は少ない。原形質基質には直径5～8 nmのマイクロフィラメントと微細小管が散見される。

細胞表面にはRR陽性の無定形物質がみられる。細胞間にはRR陽性の粒子状及びフィラメント状物質よりなる礎質で満たされ、マイクロフィブリルと径約60 nmの膠原線維が認められる。

線維芽細胞に混じって多数の大食細胞がみられる。大食細胞は多数のリソゾーム、豊富な滑面小胞体及びcoated vesiclesを有する。線維芽細胞に比べて粗面小胞体、ゴルジ装置の発達は不良である。細胞表面には小突起と、coated pitsがあり、形質膜直下にRR陽性の小胞が多数みられる(図4)。

新生毛細血管は内腔が狭く、内皮細胞はtight junction様接着装置で互いに接している。内皮細胞に接して周細胞が観察される。両者は薄い基底膜様物質で包まれている。周細胞は細胞内小器官の発達は不良で遊離リボゾームとフィラメントが多い。

創傷5日目から肉芽組織の先端に筋線維芽細胞が出現する。筋線維芽細胞はdense bodyを伴うマイクロフィラメント束で特徴づけられ、細長い原形質突起の先端部で隣接する筋線維芽細胞と接触する。処々に基底

膜様物質がみられる(図5)。マイクロフィラメント束は増殖期の線維芽細胞の形質膜に接して多少とも認められるが、肉芽組織の先端部の筋線維芽細胞に最も発達してみられる。

筋線維芽細胞は径0.5 cmの創より、径1.0 cmの創でより頻繁に観察され、径0.5 cmの創では創傷1週で線維芽細胞の約10%にみられ、以後漸減し、3週以後には認められない。

4～7ヶ月：肉芽組織は瘢痕に変わり、多量の膠原線維束の間に萎縮状の線維芽細胞が散在性に認められる。線維芽細胞は小型紡錘形で、核には深い切れ込みがみられ、狭い原形質は拡張した粗面小胞体で占められる。粗面小胞体内腔の電子密度は低く、小胞膜に付着するリボゾームはまばらである(図6)。ときどき拡張した粗面小胞体が細胞外に連絡する像に遭遇する。ゴルジ装置は萎縮状で、まれに空胞内に前述の微細フィラメントの集合がみられる。しばしば、横紋のある膠原線維を入れた細管、空胞を認めるがこれについては後に詳しく述べる。Coated vesicleが形質膜に癒合する部位に一致して細胞表面に弾力線維が証明される。

瘢痕の膠原線維の直径はほぼ均一で、約100 nmであ

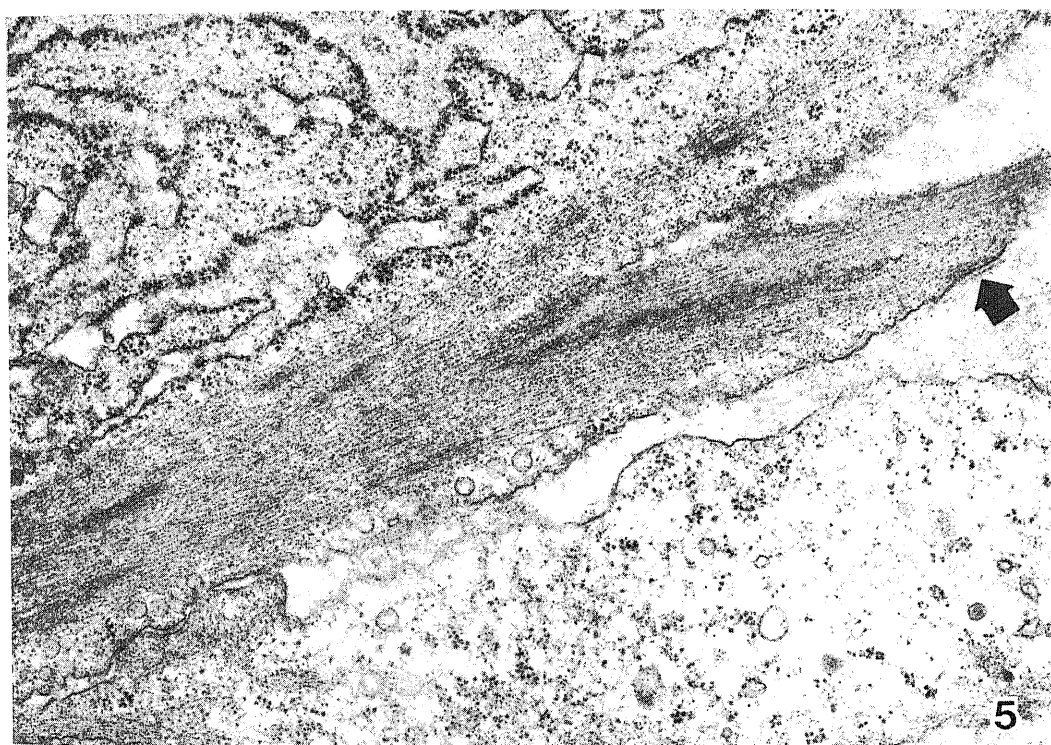


Fig. 5. Portion of a myofibroblast in a 7-day wound. Note bundles of microfilaments with dense bodies and abundant rough endoplasmic reticulum. A patch of the basement membrane can be seen (arrow). The cell contacts with an adjacent myofibroblast.  $\times 25,000$ .

るが、正常皮膚の膠原線維の直径(約 180 nm)に比べ細い。膠原線維の表面に RR 陽性物質のコーティングが証明される。線維間に粒子状、フィラメント状のプロテオグリカンは認められない。ところどころ、線維間にマイクロフィブリルに囲まれた弾力線維がみられる。再生表皮に接する瘢痕表層の膠原線維は直径約 40 nm で深部の膠原線維より細く、多数の基底膜様物質の集積がみられる。この基底膜様物質は RR 陽性の濃厚な等質性物質よりなる(図 7)。

瘢痕表層に、まれに粗面小胞体とゴルジ装置の発達した大食細胞を認めることがあるが、大部分の大食細胞は小型で原形質突起は目立たず、粗面小胞体、リソゾームは減少する。ときどき拡張した粗面小胞体や脂肪滴がみられる。毛細血管内腔は狭小となり、細長い周細胞で取り囲まれる。血管周囲に未分化間葉細胞の存在は認められない。

### 3. 創の表面積の推移

図 8 に示す如く、径 1.0 cm の創の表面積は創傷 2 週に創が再生表皮で被われるまで減少し続ける。2 週以後は再び創の表面積の増加がみられる。

## II. 瘢痕における再切創

### 1. 光顕的所見

1～3 日では表皮は対照と同じく再生するが、線維芽細胞の増殖は著しく低下する。表皮と創面との間は滲出液で満たされ、赤血球、フィブリン、単核細胞の浸潤がみられる。創の辺縁には拡張した毛細血管と好中球、単核細胞の浸潤がみられ、創周囲の瘢痕内に明るい小胞を有する紡錘形細胞が多数認められる。7 日では表皮と創縁の間は依然として滲出性変化が強く、線維芽細胞の増殖はほとんどみられない。創の周辺から毛細血管の増殖がわずかにみられるにすぎない。対照では肉芽組織の形成がみられ、鍍銀、Azan 染色で線維の形成も認められる。

### 2. 電顕的所見

1 日：創面にフィブリンの滲出と好中球の浸潤がみられる。創縁の線維芽細胞は変性に陥り、脂肪滴が多くみられる。毛細血管は拡張し、その周囲には線維性長周期 (FLS) 線維が認められることがある。

3 日：創の表面は依然として滲出性変化が強い。創縁では大食細胞の浸潤と内皮細胞の増殖がみられる。線維芽細胞の核分裂がまれにみられるが、細胞増殖は顕著ではない。注目される所見は線維芽細胞に膠原線維を含む空胞が多数みられることである。これらの線維芽細胞は紡錘形ないし類円形を呈し、核には不規

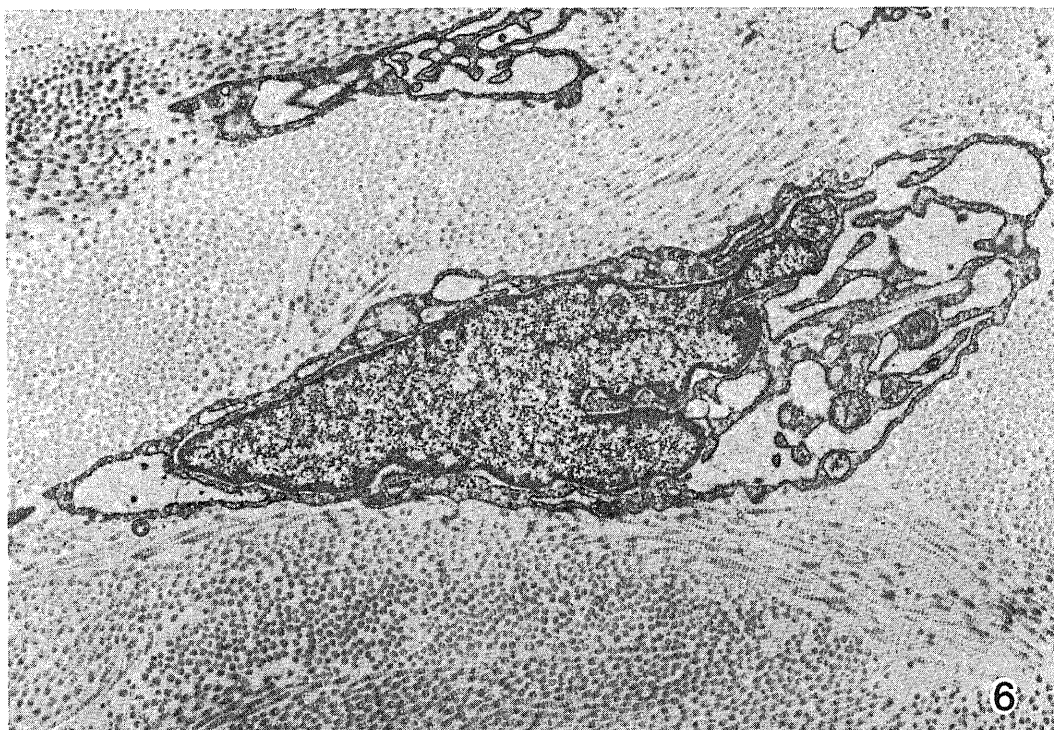


Fig. 6. Scar in a 7-month wound. A fibroblast has an indented nucleus, dilated rough endoplasmic reticulum and a few vacuoles containing collagen fibers. The extracellular space is filled with dense collagen bundles.  $\times 8,100$ .

則な陥入がみられ、原形質はほとんど線維を含む空胞によって占められる。空胞は線維の長軸に沿って細長く延長するものから、径約  $1\ \mu$  に拡張したものまである。空胞内には  $70\ \text{nm}$  の横紋を有する膠原線維が1本から10数本認められる。管状を呈する空胞内には比較的一定した太さの膠原線維がみられるが、拡張した空胞内には異常に太い線維、屈曲した線維、細線維又は無定形物質を混在するもの、膨化して横紋が不明確なものなど、膠原線維の分解を示唆するさまざまな像がみられる(図9)。これらの膠原線維を含む空胞内には酸性フォスファターゼ活性が証明される(図10)。ゴルジ装置は原形質の辺縁に圧排されている。まれにゴルジ空胞内に前述した周期のある帯をもった微細フィラメントの集合がみられる。粗面小胞体は拡張し、内腔の電子密度は低い。線維を含む空胞は瘢痕の線維芽細胞にしばしば認められるが、細胞の出現頻度、空胞の原形質に占める割合、空胞内に含まれる線維の数はいずれも切創周囲の線維芽細胞で増加する。

この線維芽細胞に接してしばしば大食細胞が観察される。大食細胞には多数のリソゾーム、coated vesicles、滑面小胞体が見られるが、線維を含む空胞はみられない(図11)。

7日：表皮と瘢痕の間には滲出液がみられ、毛細血管、大食細胞、線維芽細胞がまばらに認められる。まれに滲出液中の線維芽細胞周辺に無定形物質に包埋された細い膠原線維が認められるにすぎない。

### III. 光顕的オートラジオグラフィー

#### 1. 創傷治癒

3週齢ラットの正常皮膚では  $\text{H}^3$ -チミジンの取り込みは表皮基底細胞、panniculus adiposus 及び皮下組織の血管周囲の好塩基性細胞に散在性にみられる。創傷1日では創辺縁部、特に皮下組織の小血管周囲の細胞に取り込みがみられる。創傷3日では創縁、創底に増殖した毛細血管の内皮細胞および、周囲の線維芽細胞に強い  $\text{H}^3$ -チミジンの取り込みがみられる(図12)。再生表皮細胞、創周辺部の真皮の線維芽細胞にも散在性に銀粒子を認める。創傷5日目から7日では肉芽組織の先端部の線維芽細胞、内皮細胞が強くラベルされ、しだいに創傷中心部へと移ってゆく。

#### 2. 瘢痕再切創

対照では創縁の線維芽細胞、表皮基底細胞、毛嚢基底細胞に  $\text{H}^3$ -チミジンの取り込みがみられる。瘢痕再切創では、表皮細胞における  $\text{H}^3$ -チミジンの取り込みは対照と大差はないが、線維芽細胞における取り込みは著

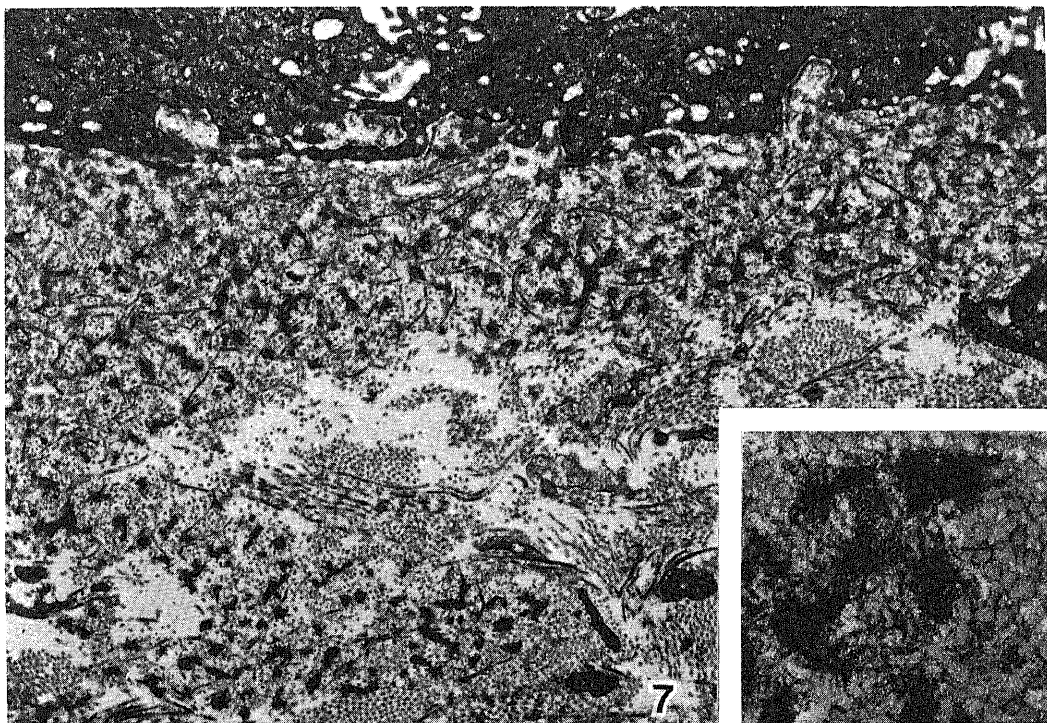


Fig. 7. Subepidermal scarring tissue of a 5-month wound, showing accumulation of basement membrane-like materials which are positively stained with RR.  $\times 9,000$ . Insert demonstrates higher magnification of the basement membrane-like materials. RR stain,  $\times 35,000$ .

しく少なく、創縁における少数の線維芽細胞にラベルがみられるにすぎない(図13)。

### 考 察

創傷治癒において肉芽組織には未分化線維芽細胞、活動性線維芽細胞の増殖が認められ、瘢痕の形成と共に退縮した線維芽細胞に変わることが観察された。又、創傷の収縮期に一致して筋線維芽細胞が認められた。これらの様々な発育期における線維芽細胞の超微構造的特徴は表1に示す通りである。

線維芽細胞の形態学的変化に伴って観察された細胞間物質の変化を表2に示す。この表に示すように、創傷肉芽組織では膠原線維とプロテオグリカンの増加があり、膠原線維が線維束をつくり瘢痕に変わるに従ってプロテオグリカンの減少が認められる。弾力線維の形成は抑制され、4ヶ月以後の瘢痕に少量の弾力線維

が電顕的に認められるにすぎない。一般に、創傷肉芽組織は瘢痕化するにしたがって、コラーゲン量、コラーゲン架橋、含水量などにおいて正常真皮のそれに近づくことが知られている<sup>20)21)</sup>。Beileyら<sup>20)</sup>は、幼若皮膚の瘢痕に沈着するコラーゲンの型と架橋のパターンは、成熟皮膚の瘢痕よりも速やかに正常真皮のそれに近づくことを報告している。しかし、本研究で示されるように、瘢痕は、膠原線維が細く、プロテオグリカンが少なく、弾力線維の形成が乏しい点で、正常真皮と異った結合組織であることは明らかである。

次に創傷治癒において出現する線維芽細胞について考察を加える。

#### 1. 未分化線維芽細胞

未分化線維芽細胞の形態学的特徴として大型の核、未発達な粗面小胞体とゴルジ装置、豊富なりボゾームの存在があげられる<sup>10)22)</sup>。これらの細胞は創傷初期に増

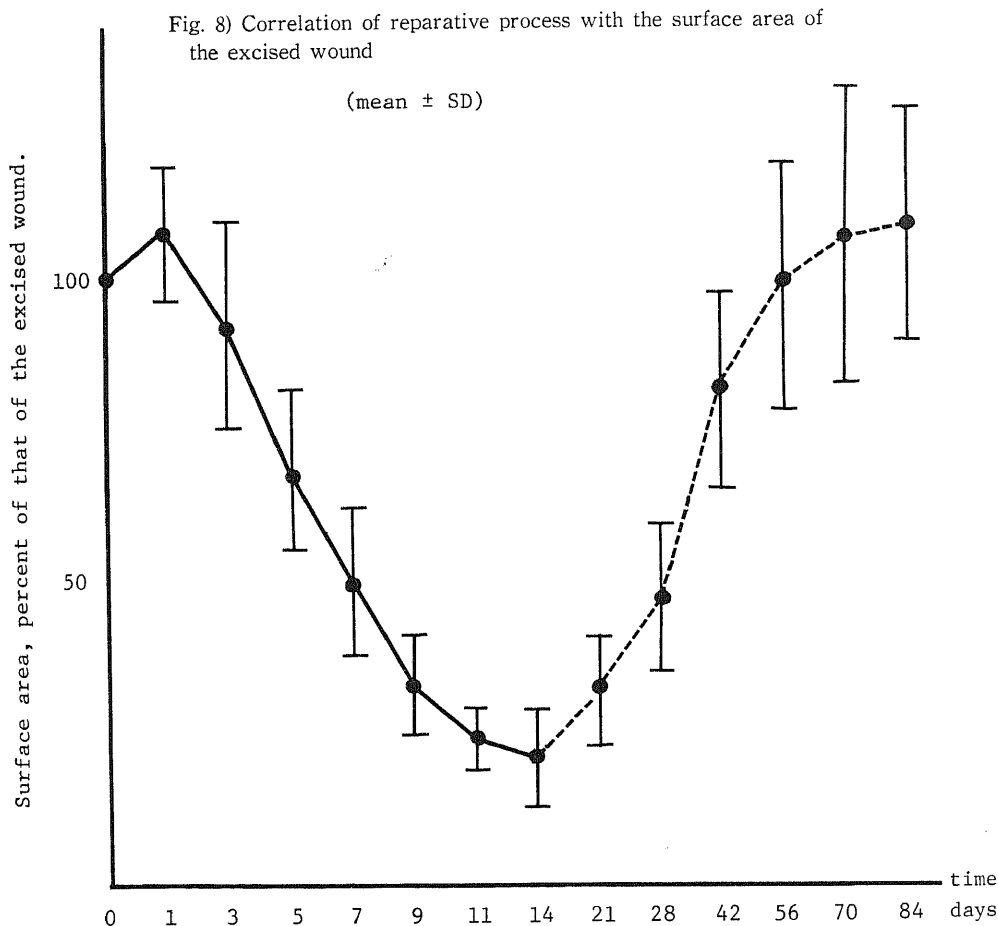


Fig.8. Change of the surface area of the wound is represented by the percentage of that of the circular wound ( $\phi$  1.0cm) created on the dorsal skin. Dotted line indicates wound size after complete regeneration of the epidermis. Note increasing wound size with the growth of animals.



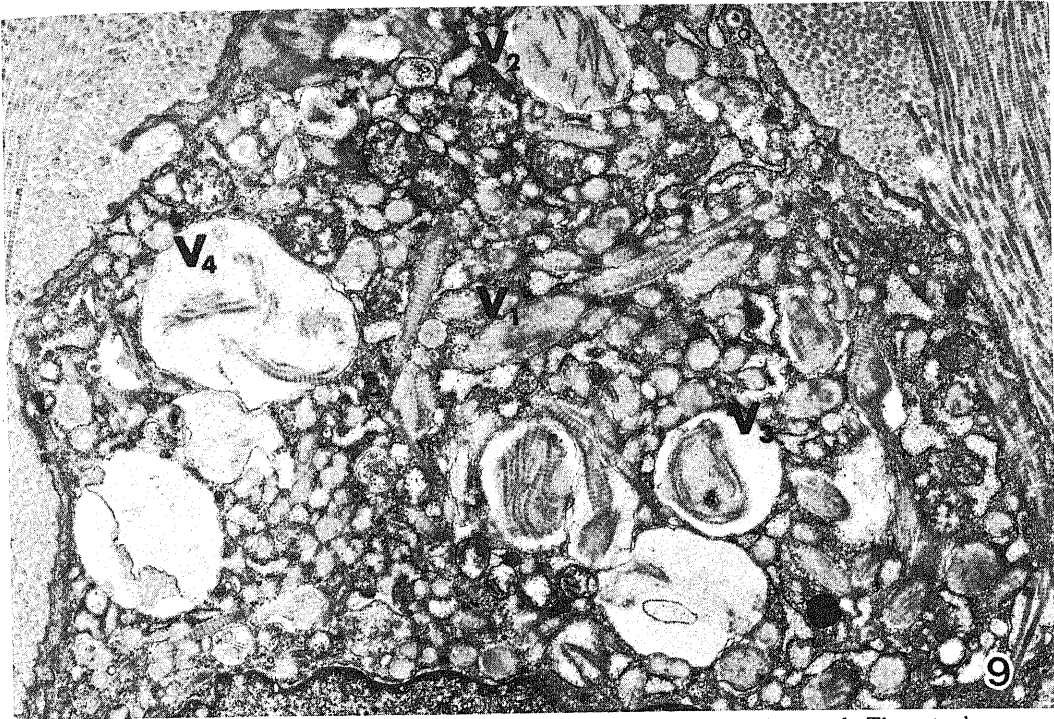


Fig. 9. Portion of a fibroblast 3 days after re - incision made in a 4 - month wound. The cytoplasm is occupied by numerous vacuoles containing collagen fibers. Collagen fibers show various patterns of degeneration, such as swelling ( $V_1$ ), dissolution ( $V_2$ ,  $V_3$ ) and fragmentation ( $V_4$ ).  $\times 9,600$ .

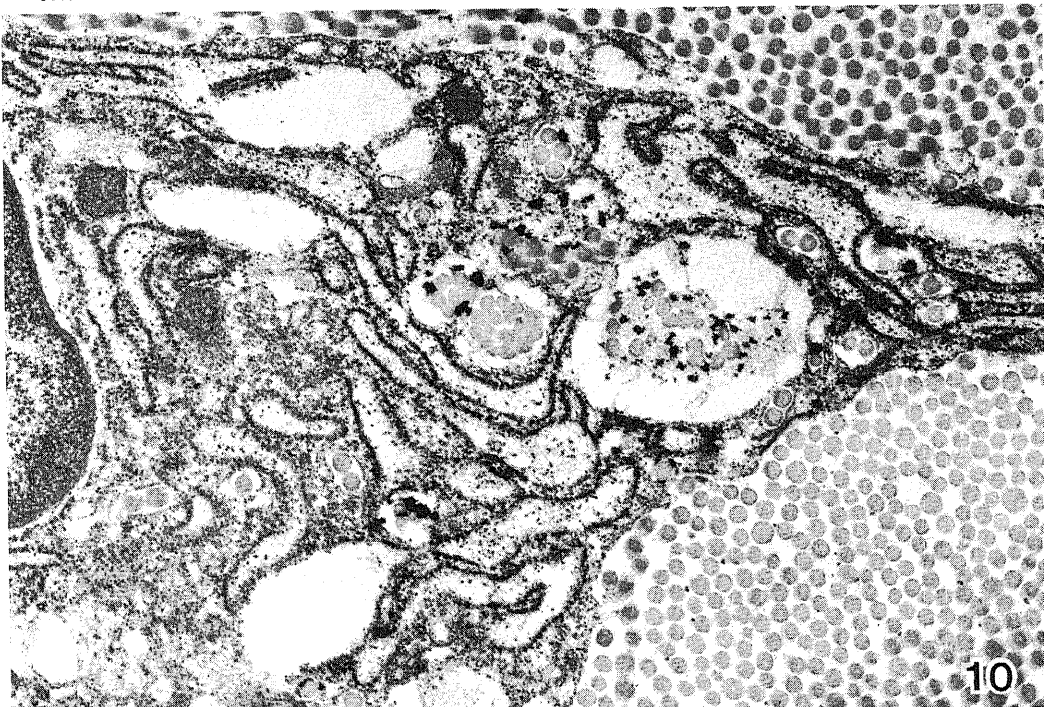


Fig. 10. Gomori's acid phosphatase reaction in a fibroblast of a 7 - month wound. Reaction products are demonstrated in the collagen fiber - containing vacuoles.  $\times 24,000$ .

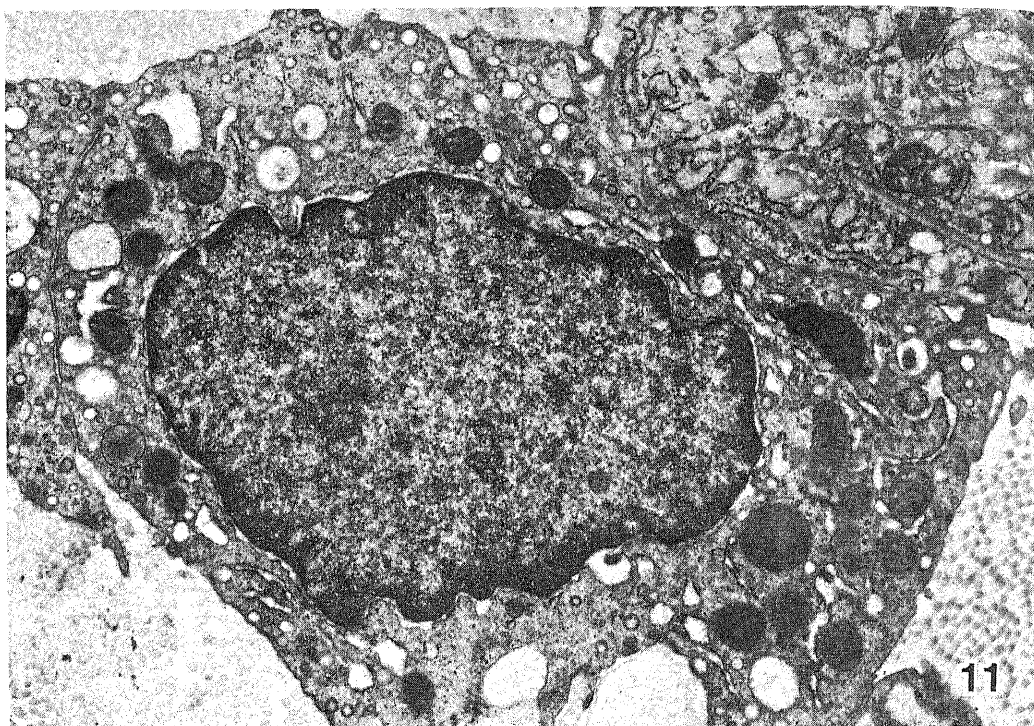


Fig. 11. A macrophage 3 days after re - incision made in a 4 - month wound. The cell contains a large number of vesicles, vacuoles and lysosomes. No vacuoles with collagen fibers are identified.  $\times 15,000$ .

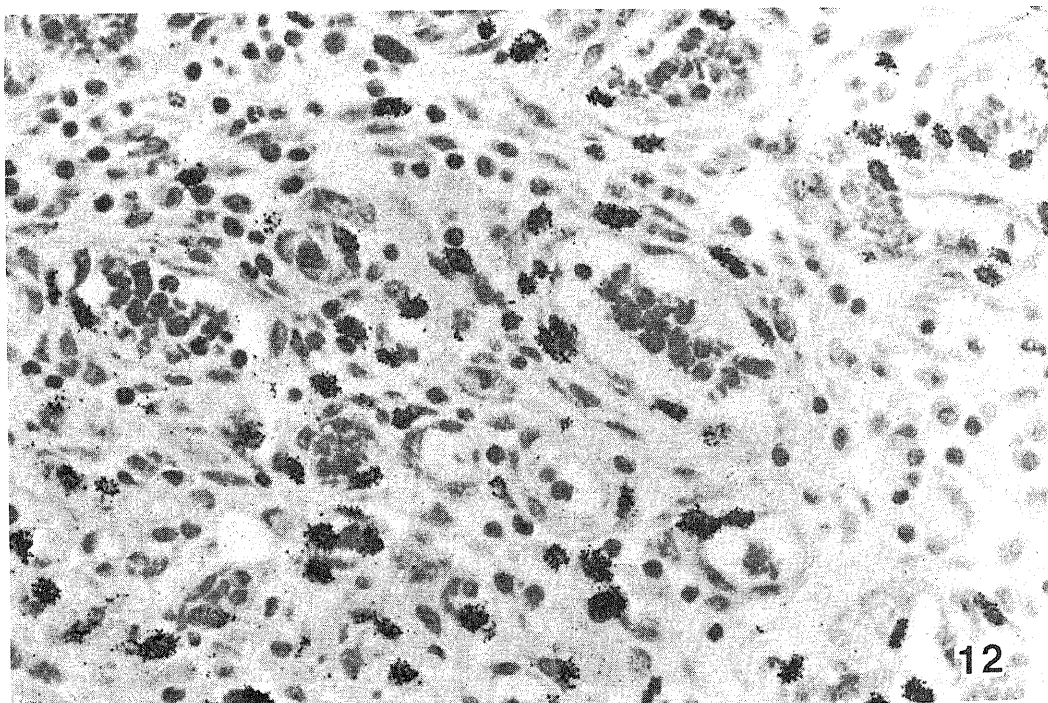


Fig. 12.  $H^3$ - Thymidine autoradiography of a 3 - day wound. Silver grains are demonstrated in the proliferating fibroblasts and endothelial cells of the blood capillaries  $\times 450$ .

殖し、次に述べる活動性線維芽細胞との間にあらゆる形態学的移行を認めることができる。線維芽細胞の起原については多くの議論がある。一部の人達は<sup>61-63</sup>、血液単球が線維芽細胞に転化すると主張しているが、現在多くの支持を得ているのは、局所の間葉細胞から発育するという意見で<sup>115,99-111</sup>である。しかし、静止期の線維芽細胞（線維細胞）が再び増殖を開始するのか、血管周囲、その他の特定部位に潜在する母細胞（progenitor cell）の増殖に由来するかについては未解決である。本研究では  $H^3$ -チミジンの取り込みが創傷初期には真皮下層の小血管周囲の細胞に集中し、時間の経過とともに肉芽組織の細胞に広がっていくことが観察された。この成績から、少なくとも小血管周囲に増殖能力の強い間葉細胞が存在することが示唆された。しかし、このような母細胞を形態学的に決定することは困難であった。

## 2. 活動性線維芽細胞

創傷5日後には線維芽細胞の活発な増殖がみられ、肉芽組織の主要な細胞成分を構成する。これらの細胞には  $H^3$ -チミジンの取り込みが多く、しばしば核分裂が認められた。活動性線維芽細胞は周知の如く、よく発達した粗面小胞体とゴルジ装置によって特徴づけられる。本研究で特に注目された所見は、ゴルジ空腔内に

フィラメント状物質が含まれ、ときどき線維性長周期（FLS）線維様の線維状物質の凝集が認められたことである。空腔内 FLS 様線維は象牙芽細胞<sup>23-25</sup>や軟骨細胞<sup>26</sup>のゴルジ空腔内にも見出され、in vitro の実験成績<sup>27</sup>に基づいて、ゴルジ装置に転送されたコラーゲンと、そこで合成されたグリコサミノグリカンとの相互作用の結果形成されるものと考えられている。これらの凝集物の運命については明らかではない。象牙芽細胞では、ゴルジ空腔はその内容の濃縮と共にリソゾーム酵素を含む「分泌顆粒」に変わることが示唆されている<sup>28</sup>。線維芽細胞では「分泌顆粒」は証明されていないが、ゴルジ空腔内で凝集したコラーゲンが細胞内でリソゾーム酵素で分解されることはありうることと思われる。合成されたプロコラーゲンの約 30 %が分泌以前に細胞内で分解されるという生化学的データ<sup>29</sup>を考慮すると、過剰のコラーゲンがゴルジ空腔内で凝集することによって、コラーゲン分泌が調節されている可能性が考えられる。

## 3. 筋線維芽細胞

筋線維芽細胞は Gabbiani ら<sup>12</sup>によって命名された平滑筋類似の線維芽細胞である。この細胞の最も大きな特徴は線維芽細胞の原形質に直径 4~8 nm のアクチンフィラメントを含むフィラメントの集束が増加することである。<sup>12,13</sup> そのほかの特徴として核の深い陥入

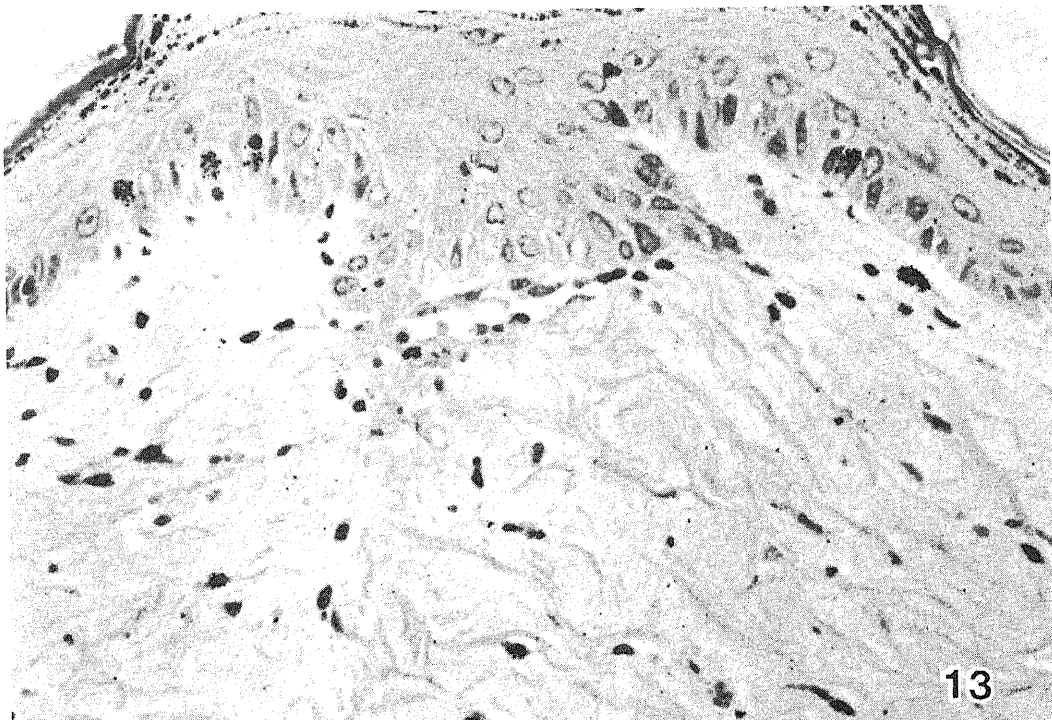


Fig. 13.  $H^3$ -Thymidine autoradiography of a 3-day re-incised wound in a 7-month wound scar. Note little uptake of  $^3H$ -thymidine in fibroblasts.  $\times 450$ .

や、基底膜様物質の付着など、平滑筋細胞に類似した形態があげられているが、これらの所見は必ずしも常に認められるとは限らない<sup>14)30)</sup>。

筋線維芽細胞が平滑筋細胞と同様な収縮能力を持つことは薬理学的に証明され<sup>15)16)</sup>、創傷収縮に対して本質的な役割を果たしているものとされている<sup>12)~17)</sup>。本研究においても創傷の表面積が減少する期間に一致して筋線維芽細胞の出現が観察された。筋線維芽細胞は再生表皮下方の肉芽組織の先端部に限局性に認められ、また、細胞はしばしば突起の先端で接触し、隣接細胞が同時に収縮することが示唆された。これらは筋線維芽細胞が創傷収縮と密接な関係を持つという見解を支持する所見である。

創傷収縮の強さは創傷の大きさに関係するので、筋線維芽細胞の増殖は大きな創傷において、より著しい。切創では筋線維芽細胞の増殖は見られない<sup>17)</sup>。Rudo-

plph ら<sup>14)</sup>は  $4 \times 2$  cm の創傷において、筋線維芽細胞は1週以内に活発に増殖し、創傷収縮の減退と共に減少し、収縮が全く止んだ16~20週で筋線維芽細胞も消失することを報告している。本研究では筋線維芽細胞の増殖が比較的短期間にしか認められなかったのは、創傷が小さいことに起因するものと思われる。上記のRudolph ら<sup>14)</sup>の実験では、創の表面積は収縮が終了後はほぼ一定値を示したが、本研究では、創傷収縮後、創の表面積は次第に増加した。この理由は明らかではないが、使用動物が幼若であったため、動物の成長と共に瘢痕も拡大した可能性がある。

筋線維芽細胞の起源については、形態学的移行から線維芽細胞に由来することは明らかである。又、創傷収縮期に一致して増殖し、創傷収縮が止むと消失することから、線維芽細胞から筋線維芽細胞への変化は可逆的で、筋線維芽細胞は線維芽細胞の一つの機能相を

Table 1. Morphologic difference of fibroblasts in the healing wound

	Undifferentiated fibroblast	Active fibroblast	Myofibroblast	Involuting fibroblast
rER	+	++ (tubular)	++ (tubular)	++ (dilated)
Golgi apparatus	+	++	++	+
Filaments in Golgi	—	+	—	+
Microfilaments	—	+	++	—
Lysosomes	—	+	+	+
Mitosis	++	++	+	—
Localization	perivascular	diffuse	base of open wound	scattered
Preponderant term	3D~1W	5D~4W	5D~2W	4M~7M

Abbreviations: rER; rough endoplasmic reticulum, D; days, W; week(s), M; months, + or — implies the degrees in appearance

Table 2. Sequential changes of the extracellular components in wound healing.

	Fibrin	Collagen	Microfibril	Elastin	Proteoglycan
Period of time					
1D~3D (Exudation)	##	—	—	—	—
5D~4W (Granulation)	+	++	##	—	##
4M~7M (Scar)	—	##	++	+	+

Abbreviations: D; day(s), W; weeks, M; month(s), ##; markedly increased, ++; moderately increased, +; mildly increased, —; not increased



表わしているものと考えられる。

#### 4. 瘢痕における線維芽細胞

肉芽組織が瘢痕化するにしたがって線維芽細胞は数と容積が減少する。細胞小器官の発達は低下し、狭い原形質は拡張した粗面小胞体で占められる。小胞膜に付着するリボゾームも減少し、嚢状の小胞腔がところどころ細胞外に穿通している。このような細胞小器官の減少と粗面小胞体の穿通によって細胞の容積の縮小が進行するものと考えられる。

退縮した線維芽細胞が刺激によって再び増殖を開始し、活動性線維芽細胞に復帰し得るか否かは興味ある問題である。この問題の解明のため、瘢痕に再切創を加えたところ、線維芽細胞の増加も、活動性線維芽細胞の出現もほとんど認められなかった。又、オートラジオグラフィによっても  $H^3$ -チミジンの取り込みはほとんど証明されなかった。これらの成績から瘢痕の線維芽細胞は増殖能力を失なった不活性細胞であると考えられる。

瘢痕の線維芽細胞における最も興味ある所見は、膠原線維を含む多数の空胞が認められることである。膠原線維には膨化や解離が認められ、酸性フォスファターゼ活性が証明されるので、空胞内でコラーゲンの分解が起こっていることが示唆される。Baur ら<sup>18)</sup>は瘢痕において同様な線維芽細胞又は筋線維芽細胞を認め、これらは膠原線維の貪食を意味するものと解釈し、それぞれ“fibroblast”、“myofibroblast”と称した。細胞内膠原線維の発生機序について、Deporter, TenCate<sup>31)</sup>は、(1)膠原線維の貪食、(2)過剰に合成されたコラーゲンの細胞内分解、(3)細胞内線維の分泌、及び(4)固定剤による人工産物の4つの可能性を指摘している。通常使用される固定剤でコラーゲンが膠原線維に凝集することはありえないので、第4の可能性は否定される。第3の可能性については、現在、多くの研究に基づいて、線維芽細胞から分泌される可溶性コラーゲン(プロコラーゲン)が細胞外で重合し膠原線維が形成されることが確立しているので(Minor<sup>32)</sup>の総説による)、細胞内線維の分泌によって細胞外線維が供給されるとは考えられない。第1と第2の可能性のいずれが正しいかを決定することは困難である。現在、最も多く支持されているのは第1の可能性である<sup>18)33)34)</sup>。細胞外で変性した膠原線維が大食細胞によって貪食されることはよく知られた事実であるが<sup>35)~37)</sup>、線維芽細胞も膠原線維を貪食しうることは *in vitro* の実験で示唆されている<sup>38)</sup>。いずれにしても膠原線維が貪食されるためには、予め細胞外で線維がなんらかの変性を受けることが必要である。Baur ら<sup>18)</sup>は“fibroblast”は組織の改造が予想される瘢痕と正常組織の境界に多く認められることから、そこでコラ

ゲンの分解が起こるものと推定した。しかし、本研究では細胞外の膠原線維の分解を示唆する形態学的証拠は見出されなかった。又、瘢痕の再切創によって、線維芽細胞内に膠原線維を含む空胞が増加するが、浸潤した大食細胞には膠原線維の貪食は決して認められない。これらの所見は線維芽細胞内の膠原線維が貪食を表わしているという見解に疑問を投げかける。

残された可能性は、過剰に合成されたコラーゲンの細胞内分解である。瘢痕化の過程で細胞外に多量のコラーゲンが沈着するにつれてコラーゲンの分泌が次第に抑制され、合成された過剰のコラーゲンが線維を形成し、リゾゾーム酵素によって分解されることはありうると思われる。瘢痕の再切創によって細胞内線維が増加するのは、コラーゲン合成への刺激が加わったため、過剰コラーゲン量の増加した結果であると解釈されよう。

周知のように、膠原線維が形成されるためには、プロコラーゲンがプロコラーゲン・ペプチターゼによってトロポコラーゲンに変わることが必要である。この反応が線維芽細胞内で起こるか否かは十分解明されていない。現在、2, 3の研究者<sup>31)39)</sup>によってプロコラーゲン・ペプチターゼがプロコラーゲンを含む小胞に転送され、細胞内でトロポコラーゲンの生成が起こる可能性が示唆されているが、細胞内線維の形成と分解の機序については今後の研究が必要である。

線維芽細胞内の膠原線維を含む空胞の存在は瘢痕のみならず、他の様々な結合組織、特に組織の改造が行なわれる場合にしばしば観察されることは多くの人達によって報告されている<sup>19)22)30)31)33)34)40)~44)</sup>。これらの細胞内線維の発生機序と意義がすべて同一であるとは限らないが、少なくとも瘢痕の線維芽細胞においては、上述の考察から、膠原線維の貪食とみなすより、過剰コラーゲンの細胞内消化と解釈する方がより合理的と思われる。

## 結 論

ラット皮膚創傷治癒における線維芽細胞の超微構造的変化を創傷1日から7ヶ月にわたって電顕的、光顕的に観察した結果を得た。

1.  $H^3$ -チミジンを用いたオートラジオグラフィの成績は線維芽細胞の増殖が主として創縁の小血管周囲の未分化間葉細胞からおこることを示唆した。

2. 活動期の線維芽細胞のゴルジ空胞内には、しばしばFLS線維様の凝集物が認められ、合成されたコラーゲンの一部は細胞外に分泌されずに細胞内で凝集する可能性が示唆された。

3. 増殖した線維芽細胞の一部は肉芽組織の先端部で筋線維芽細胞に変化し、創傷収縮に関与することが

示された。

4. 創傷の癒着化とともに線維芽細胞は、細胞内小器官の減少と、拡張した粗面小胞体の細胞外への穿通によってその容積を減少し、退縮線維芽細胞へ変化することが観察された。

5. 癒着の再切創によっても退縮した線維芽細胞に $H^3$ -チミジンの取りこみはほとんどみられず、活動性線維芽細胞への復帰はみられなかった。

6. 癒着の線維芽細胞、特に再切創周辺部の線維芽細胞に膠原線維を含む多数の空胞が観察され、膠原線維のさまざまな分解像とともに酸性フォスファターゼ活性が証明された。これらの細胞内線維は膠原線維の貪食とみなすよりも、過剰に合成されたコラーゲンの細胞内分解を意味すると解釈された。

## 謝 辞

御指導と御校閲を賜りました恩師堀川欽一郎教授に感謝の意を表します。また研究遂行に際して御助言、御協力を戴きました教室員各位と電子顕微鏡技術員の方々に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Ross, R.: The fibroblast and wound repair. *Biol. Rev.*, **43**, 51 - 96 (1968).
- 2) Shilling, J. A.: Wound healing. *Physiol. Rev.*, **48**, 374 - 423 (1968).
- 3) DeVito, R. V.: Healing of wounds. *Surg. Clin. North. Amer.*, **45**, 441 - 459 (1968).
- 4) Shoshan, S. & Gross, J.: Biosynthesis and metabolism of collagen and its role in tissue repair processes. *Isr. J. Med. Sci.*, **10**, 537 - 561 (1974).
- 5) Ross, R., Everett, N. B. & Tyler, R.: Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. *J. Cell Biol.*, **44**, 645 - 654 (1970).
- 6) Petrakis, N. L., Danis, M. & Lucis, S. P.: The in vivo differentiation of human leukocytes into histiocytes, fibroblasts and fat cells in subcutaneous diffusion chamber. *Blood*, **17**, 109 - 118 (1961).
- 7) Allgower, M. & Hulliger, L.: Origin of fibroblasts from mononuclear blood cells: a study on in vitro formation of the collagen precursor by hydroxyproline in buffy coat culture. *Surgery*, **47**, 603 - 610 (1960).
- 8) Gillmann, T. & Wright, L. J.: Autoradiographic evidence suggesting in vivo transformation of some blood mononuclears in repair and fibrosis. *Nature*, **209**, 1086 - 1090 (1966).
- 9) Grillo, H. C.: Origin of fibroblasts in wound healing: an autoradiographic study of inhibition of cellular proliferation by focal X - irradiation. *Ann. surg.*, **157**, 453 - 467 (1963).
- 10) Ross, R. & Odland, G.: Human wound repair. II. Inflammatory cells, epithelial - mesenchymal interrelations and fibrogenesis. *J. Cell Biol.*, **39**, 152 - 168 (1969).
- 11) MacDonald, R. A.: Origin of fibroblast in experimental healing wound. Autoradiographic studies using tritiated thymidine. *Surgery*, **46**, 376 - 382 (1959).
- 12) Gabbiani, G., Ryan, G. B. & Majno, G.: Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, **27**, 549 - 550 (1971).
- 13) Majno, G., Gabbiani, G., Hirschel, B. J., Ryan, G. B. & Statkov, P. R.: Contraction of granulation tissue in vitro: Similarity to smooth muscle. *Science*, **173**, 548 (1971).
- 14) Rudolph, R. & Guber, S. & Woodward, M.: Inhibition of myofibroblasts by skin grafts. *Plast. Reconstr. Surg.*, **63**, 473 - 480 (1979).
- 15) Gabbiani, G., Hirschel, B. J., Ryan, G. B., Statkov, P. R. & Majno, G.: Granulation tissue as a contractile organ: a study of structure and function. *J. Exp. Med.*, **135**, 719 - 734 (1972).
- 16) Morton, D. J., Madden, J. W. & Peacock, E. E. J.: Effects of a local smooth muscle antagonist on wound contraction. *Surg. Forum.*, **23**, 511 - 512 (1972).
- 17) Ryan, G. B., Cliff, W. J., Gabbiani, G., Irle, C., Montandon, D. & Majno, G.: Myofibroblasts in human granulation tissue. *Hum. Pathol.*, **5**, 55 - 67 (1974).
- 18) Baur, P. J., Barratt, G. F., Brown, G. M. & Parks, D. H.: Ultrastructural evidence for the presence of "fibroclasts" and "myofibroclasts" in wound healing tissue. *J. Trauma*, **19**, 744 - 756 (1979).
- 19) TenCate, A. R. & Freeman, E.: Collagen remodelling by fibroblasts in wound repair. Preliminary observations. *Anat. Rec.*, **179**, 543 - 546 (1974).
- 20) Bailey, A. J., Bazin, S., Sins, T. T., LeLous,

- M., Nicoletis, C. & Delaunay, A.: Characterization of the collagen of human hypertrophic and normal scars. *Biochem. Biophys. Acta*, **405**, 412 - 421 (1975).
- 21) Shuttleworth, C. A., Forrest, L. & Jackson, D. S.: Comparison of the cyanogen bromide peptides of insoluble guinea-pig skin and scar collagen. *Biochem. Biophys. Acta*, **379**, 207 - 216 (1975).
- 22) Buntrock, P.: Ultrastrukturelle Charakterisierung von Fibroblasten, Myofibroblasten und Fibroblasten in Wundheilungsprozeß. *Zentralbl. Allg. Pathol.* **124**, 48 - 59 (1980).
- 23) Weinstock, N. & Leblond, C. P.: Synthesis, migration and release of precursor collagen by odontoblasts as visualized by radioautography after  $^3\text{H}$ -proline administration. *J. Cell Biol.*, **60**, 92 - 127 (1974).
- 24) 柿原昌一郎: ラット象牙芽細胞におけるコラーゲン産生に関する電子顕微鏡的研究. 十全医会誌, **83**, 827 - 845 (1974).
- 25) Kajikawa, K. & Kakihara, S.: Odontoblasts and collagen formation: An ultrastructural and autoradiographic study. *J. Electronmicroscopy.*, **23**, 9 - 17 (1974).
- 26) Dearden, L. C.: Periodic fibrillar material in intracellular vesicles and in electron-dense bodies in chondrocytes of rat costal and tracheal cartilage at various ages. *Am. J. Anat.*, **144**, 323 - 338 (1975).
- 27) Gross, J.: The behavior of collagen units as a model in morphogenesis. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, **2 Suppl.** 261 - 274 (1956).
- 28) Nagai, N.: Ultrastructural localization of acid phosphatase in odontoblasts of young rat incisors. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.*, **11**, 85 - 120 (1970).
- 29) Bienkowski, R. S., Cowan, M., McDonald, J. A. & Crystol, R. G.: Degeneration of newly synthesized collagen. *J. Biol. Chem.*, **253**, 4356 - 4363 (1978).
- 30) Squire, C. A. & Kremenak, C. R.: Myofibroblasts in healing palatal wounds of the beagle dogs. *J. Anat.*, **130**, 585 - 594 (1980).
- 31) Deporter, D. A. & TenCate, A. R.: Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase in collagen-containing vesicles of fibroblasts. *J. Anat.*, **114**, 457 - 461 (1973).
- 32) Minor, R. R.: Collagen metabolism. A Comparison of diseases of collagen and diseases affecting collagen. *Am. J. Pathol.*, **98**, 225 - 280 (1980).
- 33) TenCate, A. R. & Deporter, D. A.: The degradative role of the fibroblast in the remodelling and turnover of collagen in soft connective tissue. *Anat. Rec.*, **182**, 1 - 14 (1975).
- 34) Melcher, A. H. & Chan, J.: Phagocytosis and digestion of collagen by gingival fibroblasts in vivo: A study of serial sections. *J. Ultrastruct. Res.*, **77**, 1 - 36 (1981).
- 35) 近藤勝彦: カラギニン肉芽腫におけるコラーゲン分解に関する研究. [I] カラギニン肉芽腫中のコラーゲン分解因子. 十全医会誌, **83**, 163 - 173 (1974).
- 36) 寺田督: 分娩退縮時におけるラット子宮筋層の超微構造的変化. 十全医会誌, **85**, 222 - 238 (1976).
- 37) Ghadially, F. N.: Collagen in lysosomes. p354 - 355, In *Ultrastructural pathology of the cell*, Butterworth, London, Boston, 1975.
- 38) Svoboda, E. L. A., Brunette, D. M. & Melcher, A. H.: In vitro phagocytosis of exogenous collagen by fibroblasts from the periodontal ligament: an electron microscopic study. *J. Anat.*, **128**, 301 - 314 (1979).
- 39) Bornstein, P. & Ehrlich, H. P.: The intracellular translocation and secretion of collagen, p321 - 338, In E. Kulonen & J. Pikkarainen (eds), *Biology of fibroblast.*, Academic Press, London, 1973.
- 40) TenCate, A. R.: Morphological studies of fibrocytes in connective tissue undergoing rapid modeling. *J. Anat.*, **112**, 401 - 414 (1972).
- 41) Allegra, S. R. & Brodrick, P. A.: Desmoid fibroblastoma. Intracytoplasmic collagenosynthesis in a peculiar fibroblastic tumor: Light and ultrastructural study of a case. *Hum. Pathol.*, **4**, 419 - 429 (1973).
- 42) TenCate, A. R. & Syrby, S.: A relationship between alkaline phosphatase activity and the phagocytosis and degradation of collagen by the fibroblast. *J. Anat.*, **117**, 351 - 359 (1974).
- 43) Yee, J. A.: Response of periodontal ligament cells to orthodontic force: Ultrastructural identification of proliferating fibroblasts. *Anat. Rec.*, **194**, 603 - 614 (1979).
- 44) Goellner, J. R. & Soule, E. H.: Desmoid tumors. An ultrastructural study of eight cases. *Hum. Pathol.*, **11**, 43 - 50 (1980).

**Ultrastructural Changes of Fibroblasts in Wound Healing of Rats** Akishi Ooi, Department of Pathology (I) (Director: Prof. K. Kajikawa), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Jusen Med. Soc., **91**, 923—938 (1982)

**Key words:** fibroblasts, myofibroblasts, scar, intracellular collagen fibers.

#### **Abstract**

Wound healing courses of fibroblasts of the rat skin were investigated by light and electron microscopy, successively during a period of 1 day to 7 months after an artificial excision. In autoradiography using tritiated thymidine, it was strongly suggested that proliferating fibroblasts were derived from primitive mesenchymal cells around small blood vessels. Concomitant with wound contraction, some fibroblasts were observed to transform into myofibroblasts, which were characterized by the presence of intracytoplasmic microfilaments, dense bodies and focal basement membrane. As wound scarring progressed, cell organelles of fibroblasts reduced in number and rough endoplasmic reticulum dilated and perforated into the extracellular space, resulting in diminution of volume of the fibroblasts. This sequence of cellular changes of fibroblasts was considered to be irreversible on the basis of the fact that tritiated thymidine uptake in the involuting fibroblasts was scarcely demonstrated and that the fibroblasts did never alter to an active form even though an additional incision was made in the area of the original wound in order to stimulate their cellular activity. It was noted that the fibroblasts in the scarring tissue had many vacuoles containing collagen fibers in which acid phosphatase reaction was positive. Particular discussion was made as to whether such intracellular collagen fibers represented phagocytized collagen fibers or intracellular collagen aggregates induced by overproduction of collagen.